Aus dem Anatomischen Institut, Lehrstuhl II
der Universität Düsseldorf,
Direktor: Professor Dr. med. H.G. Goslar

DIE WIRKUNG VON ORGANOPHOSPHATEN AUF DIE AKTIVITÄT EINIGER ADENOSINTRIPHOSPHATASEN DES RATTENHERZMUSKELS

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf

vorgelegt von
UTE DIERKES-TIZEK
Düsseldorf 1982

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536505_0066

Aus dem Anatomischen Institut, Lehrstuhl II
der Universität Düsseldorf,
Direktor: Professor Dr. med. H.G. Goslar

DIE WIRKUNG VON ORGANOPHOSPHATEN AUF DIE AKTIVITÄT EINIGER ADENOSINTRIPHOSPHATASEN DES RATTENHERZ-MUSKELS

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Dokorgrades der
Medizinischen Fakultät der Universität Düsseldorf
vorgelegt von
UTE DIERKES-TIZEK
Düsseldorf 1982

Herrn Prof. Dr. Med. H.G. GOSLAR gebührt mein Dank für die Überlassung des Themas dieser Arbeit.

Herrn Priv. Doz. Dr. rer. nat. H. HETTWER danke ich besonders für die freundliche und ausführliche Unterstützung bei der Durchführung und Abfassung dieser Arbeit.

Fräulein G. BERTHOLD und Fräulein M. ERDMANN gilt mein Dank für ihre technische Assistenz.

Inhaltsverzeichnis

1.	EINLEITUNG	
1.1.	ATPasen, ihre Funktionen am Herzmuskel	3
1.2.	ATPasen, ihre Stimulatoren und Inhibitoren	4
1.3.	Zielsetzung	5
2.	MATERIAL UND METHODEN	
2.1.	Tiermaterial	6
2.2.	Substanzen	6
2.3.	Versuchsdurchführung	6
2.3.1.	Giftapplikation und Organgewinnung	6
2.3.2.	Enzymaktivitäten	7
2.3.2.1.	Biochemische Bestimmungsmethoden	7
2.3.2.2.	Histochemische Nachweisverfahren	10
2.4.	Statistische Auswertung	11
3.	ERGEBNISSE	
3.1.	ATPasen-Aktivität in Abhängigkeit von der Giftdosis unter Antidotschutz	12
3.1.1.	Das Aktivitätsverhalten der Na^+/K^+-ATPase	12
3.1.2.	Das Aktivitätsverhalten der Ca^{++}-ATPase	12
3.2.	ATPasen-Aktivität in Abhängigkeit von Antidoten bzw. deren Kombination bei Paraoxon-Intoxikation	13
3.2.1.	Das Aktivitätsverhalten der Na^+/K^+-ATPase	13
3.2.2.	Das Aktivitätsverhalten der Ca^{++}-	14

	ATPase	
3.3.	ATPasen-Aktivität in Abhängigkeit von der Vergiftungsdauer	14
3.3.1.	Das Aktivitätsverhalten der Na^+/K^+-ATPase	14
3.3.2.	Das Aktivitätsverhalten der Ca^{++}-ATPase	15
3.4.	Aktivitätsverhalten der Mg^{++}- stimulierten ATPase nach DFP- bzw. Paraoxon-Applikation im histochemischen Präparat	16
3.4.1.	Herzmuskel	16
3.4.2.	Skelettmuskel	19
4.	DISKUSSION	
4.1.	Die kardiotoxischen Symptome einer Alkylphosphat-Vergiftung durch	25
4.1.1.	Direkte Hemmung der ATPasen-Aktivität	25
4.1.2.	Endogen erhöhtes ACh	28
4.1.3.	Hypoxie	29
4.2.	Bedeutung der genannten Ursachen für Aktivitätsänderungen der ATPasen	30
4.2.1.	Nach einmaliger Organophosphat-Applikation	30
4.2.2.	Nach subchronischer täglicher Applikation	34
5.	ZUSAMMENFASSUNG	38
6.	LITERATURVERZEICHNIS	40

1. EINLEITUNG

Herzmuskelzelle und quergestreifte Skelettmuskulatur sind sich in Bezug auf ihren morphologischen Aufbau und ihre physiologisch-funktionellen Abläufe ähnlich. Voraussetzung für die Erregungsfähigkeit der Muskelzellen ist ein am Sarkolemm errichtetes Potential, das durch die unterschiedlichen Ionenverteilungen und damit unterschiedlichen Ladungen intra- und extrazellulär hervorgerufen wird. Das Potential ist an eine intakte Membranstruktur gebunden und vor allem von der Aktivität einer dort lokalisierten Na^+/K^+- aktivierten ATPase, der Transport-ATPase, abhängig. Dieses Enzym transportiert bei der Erregung in das Sarkomer gelangtes Na^+ wieder nach außen bzw. nach extrazellulär geströmtes K^+ in die Zelle zurück (SKOU 1965; GLYNN 1968; GLYNN und KARLISH 1975; FIRTH 1978).
Auf einen Reiz hin kommt es zu einer Erregung, d.h. Depolarisation, des Sarkolemms mit anschließender Kontraktion des Sarkomers. Ca^{++}- Ionen werden aus ihren intrazellulären Depots, den longitudinalen Tubuli (L-System) des sarkoplasmatischen Retikulums, freigesetzt, wobei gleichzeitig beim Herzmuskel der Nachstrom extrazellulären Ca^{++} durch die transversalen Tubuli (T-System) eingeleitet wird. Die Ionen gelangen in Kontakt mit den kontraktilen Filamenten, worauf sich Querbrücken(-bindungen) zwischen dem Aktin und dem Myosin mittels einer Ca^{++}- stimulierten ATPase, der sogenannten myofibrillären oder kontraktilen ATPase, bilden (HASSELBACH und WEBER 1966; FIRTH 1978).

Für die oben beschriebenen Reaktionsabläufe aus Erregung, Calciumfreisetzung und Muskelkontraktion - die elektromechanische Kopplung - sind die genannten ATPasen von fundamentaler Bedeutung. Diese Kopplungsmechanismen sind energieabhängig und damit an das ausreichende Vorhandensein von ATP und anderen energiereichen Phosphaten gebunden. Die für die Kontraktion notwendige Energie wird von einer Protonen-translozierenden ATPase, die Mg^{++} stimulierbar (MEIJER 1980) und an die innere Mitochondrienmembran gebunden ist, bereitgestellt (MITCHELL 1974; FIRTH 1978; vgl. JUNGERMANN und MÖHLER 1980).

Für die aufgeführten ATPasen sind Stimulatoren und Inhibitoren bekannt. Die Sarkolemm gebundene ATPase wird stimuliert durch extrazelluläres K^+ und intrazelluläres Na^+ und gehemmt durch Oligomycin, Ouabain und andere Herzglycoside (WHITTAM 1962; GLYNN 1968; DAHL und HOKIN 1974; FIRTH 1978). Die myofibrilläre ATPase läßt sich durch Ca^{++}- Ionen aktivieren und durch SH-Gruppen-Blocker inhibieren (SEKINE et al. 1962; HASSELBACH und WEBER 1966; SEIDEL 1969; REISLER et al. 1974). Die Protonen-translozierende ATPase ist durch Entkoppler der oxidativen Phosphorylierung wie z.B. Dinitrophenol (DNP) aktivierbar und wird durch Oligomycin und Substanzen, die mit SH-Gruppen reagieren wie z.B. P-Chloromercuribenzoat (PCMB) (FIRTH 1978) gehemmt. Eine unspezifische Reaktion mit freien SH-Gruppen der ATPasen wird ebenso für die Phosphorsäureester von LAHIRI und WILSON (1970) angenommen, wobei dies als eine mögliche Erklärung für die hemmende Wirkung auf die Enzymaktivität erachtet wird. Zum anderen werden auch, wie für die Cholin-

esterasen, Konformationsänderungen der ATPasen durch Phosphorylierung des Serins im aktiven Zentrum vermutet (vgl. OOSTERBAAN und COHEN 1964; HOKIN et al. 1966; SACHS et al. 1969).

Ausdruck dieser direkten Wirkung der Organophosphate auf den Herzmuskel sollen Verringerung der Kontraktionskraft mit letztendlichem Herzversagen sein (LOOMIS und SALAFSKY 1964; WOLTHUIS und MEETER 1968), während sich Sinusbradykardien und AV-Überleitungsstörungen auf die endogene AChE-Vergiftung zurückführen lassen (PASI und LEUZINGER 1970; NAMBA et al. 1970; NAMBA 1971; ENGEL et al. 1974; OKONEK 1975). Die direkte hemmende Wirkung ist bisher nur für die Transport-ATPase angenommen (LOOMIS und SALAFSKY 1964; WOLTHUIS und MEETER 1968) und auch am isolierten Enzym in in vitro Versuchen biochemisch nachgewiesen worden (SACHS und HIRSCHOWITZ 1965; HOKIN et al. 1966; SACHS et al. 1969; DIPALMA et al. 1970; JOVIC et al. 1971; BROWN und SHARMA 1976; HETTWER 1981).

Eine Einschränkung der Na^+/K^+- ATPase ist von HETTWER (1981) auch mittels histochemischer Verfahren an Rattenniere, Rattenpankreas und am Schweineherz beschrieben worden, wobei sich am Pankreas auch eine Hemmung der Ca^{++}-abhängigen ATPase ergeben hat. Die bisherigen histochemisch-elektronenmikroskopischen Untersuchungen lassen auch Ultrastrukturveränderungen an der quergestreiften Muskulatur erkennen. So sind von HETTWER (1981) Schwellung und Cristolyse von Muskelmitochondrien am Zwerchfell der Ratte beobachtet worden. Diese haben zunächst eine Aufhebung der Querstreifung der Myofilamente zur Folge, wobei dann mit

fortschreitender Degeneration auch die Parallelanordnung der Myofilamente aufgehoben wird. Weiterhin kommt es zur Schwellung des sarkoplasmatischen Retikulums, zur Zellkernzerklüftung mit dadurch bedingter scheinbarer Einlagerung von Organellenbestandteilen in den Kern und zur Bildung weitmaschiger Nukleolen.

Ziel unserer Arbeit ist es daher, den in vivo Einfluß einiger Organophosphate weiter zu verfolgen. So soll sich an Hand von biochemischen Aktivitätsbestimmungen am Rattenherzen bei akuter und subchronischer Giftapplikation zeigen, ob die kardiotoxische Wirkung der Organophosphatester, wie von OKONEK (1977) vermutet, Ursache der plötzlichen kardialen Komplikationen sein könnte. Histochemische Nachweismethoden sollen Auskunft darüber geben, ob die Organophosphate auch Einfluß auf die biochemisch nur schwer erfaßbare Protonen-translozierende ATPase und damit Einfluß auf die oxidative Phosphorylierung nehmen.

2. MATERIAL und METHODEN

2.1. Tiermaterial

Als Versuchstiere für die biochemischen und histochemischen Untersuchungen dienten weibliche Wistar Ratten von 180 - 220 g Körpergewicht (KG). Als Futter erhielten die Tiere Altromin Standarddiät für Ratten und Trinkwasser ad libitum.

2.2. Substanzen

Die Organophosphate Paraoxon, Parathion und DFP bezogen wir von der Fa. Serva, Heidelberg, Toxogonin und Atropinsulfat von der Fa. Merck, Darmstadt.

2.3. Versuchsdurchführung

2.3.1. Im akuten Versuch wurden die Ratten 24 h nach Alkylphosphat-Gabe dekapitiert, danach jeweils das Herz sofort freipräpariert und entnommen. Die verabreichte Giftkonzentration betrug zunächst eine LD_{50}, d.h. für DFP 3,92 mg/kg KG und für Paraoxon 0,69 mg/kg KG. Die entsprechenden Phosphatestermengen wurden in 1 ml einer Mischung aus 98% physiologischer NaCl-Lösung und 2% abs. Äthanol aufgelöst und anschließend den Ratten i.p. injiziert.

Bei Verabreichung mehrfach höherer Giftkonzentrationen als einer LD_{50} von DFP bzw. Paraoxon wurde den Tieren einmalig Atropin (7,5 mg/kg KG) bzw. Toxogonin (12,5 mg/kg KG) allein oder beide kombiniert - in gleicher oder halber Dosierung - unmittelbar nach Giftgabe i.m. ge-

spritzt. Bei subchronischer Vergiftung wurde täglich 1/4 der LD_{50} von DFP (0,98 mg/kg KG), von Paraoxon (0,17 mg/kg KG) und von Parathion (0,27 mg/kg KG) i.p. appliziert. Alle fünf Tage wurden 12 Ratten aus dem Versuch genommen und durch Dekapitation getötet.

2.3.2. Aktivitätsbestimmungen

2.3.2.1. Zur biochemischen Aktivitätsbestimmung der ATPasen wurde von jedem Herzen die Ventrikelmuskulatur auf ein einheitliches Gewicht von 0,9 g eingewogen und anschließend zweimal in 0,5 M KCl - 50 mM Tris/HCl Puffer, pH 7,4, gewaschen. Es folgte die Homogenisation in 10 ml Tris/HCl Puffer gleicher Konzentration in einem Glas-Teflon-Homogenisator (nach Potter-Elvehjam) für 90 s bei Eiskühlung. 1 ml dieses Homogenats mischten wir mit 50 ml Tris/HCl Puffer und filtrierten danach durch achtfache Mullagen. Vom Filtrat wurden jeweils 2 ml entnommen und für die Aktivitätsbestimmungen der ATPasen eingesetzt. Das Endvolumen der Inkubationsansätze betrug 10 ml, die Inkubationszeit 10 min bei 37°C.

Die Aktivität der Na^+/K^+- ATPase bestimmten wir entsprechend der Methode von BRUNETTE und TILL (1971). Dabei wurden die Aktivitätswerte der gesamten Na^+/K^+- ATPase, in die die Mg^{++}- ATPase-Aktivität miteingeht, und der Mg^{++}- ATPase getrennt nachgewiesen. Die reine Na^+/K^+- ATPase ergab sich aus der Differenz der Werte dieser beiden ATPasen. Bei den Angaben in unseren Tabellen handelt es sich um diese reine, Ouabain-empfindliche, d.h. um die durch 1 mM Ouabain hemmbare ATPase. Die myofibrilläre ATPase-Aktivität wurde nach den Angaben von BARANY et al. (1967) gemessen.

Die jeweiligen Aktivitätswerte der ATPasen ergaben sich durch photometrische Messungen der Extinktion (Beckman Spectrophotometer DB-GT) eines Farbkomplexes aus freigesetztem anorganischem Phosphat und Molybdovanadat bei 350 nm entsprechend der Methode von LIN und MORALES (1977).

Ziel unserer Versuchsdurchführung war, die verschiedenen ATPasen aus einem Gesamthomogenat voneinander zu unterscheiden und ihr Aktivitätsverhalten in Abhängigkeit von den Alkylphosphatgaben zu verfolgen; die ATPasen-Aktivität in einzelnen Zellkompartimenten blieb dabei unberücksichtigt.[1] Wir konnten so auch die physiologischen Bedingungen innerhalb der Muskelzelle weitgehend erhalten und damit Veränderungen am Troponin-Tropomyosin-Komplex durch umfangreiche Isolierungsprozesse verhindern. Solche Veränderungen finden nach SCHEURER und BHAN (1979) ihren Ausdruck in einer Störung der Phosphorylierung des ATP durch das Myosin und führen zu schwer interpretierbaren Meßergebnissen. In von uns zunächst durchgeführten Vorversuchen zeigte sich auch, daß die ATPasen bei intaktem kontraktilem System voneinander differenziert werden konnten, da durch spezifische Inhibitoren eine Hemmung der jeweiligen ATPase festzustellen war. Als Inhibitoren der myofibrillären ATPase verwandten wir DNP 1 x 10^{-4} M bzw. 1 x 10^{-4} M plus Oligomycin 1 mg/50 ml (s. MEIJER 1970), als Inhibitor der Na^+/K^+- ATPase Ouabain 1 x 10^{-3} M (BRUNETTE und TILL 1971).

---

[1] Aus diesem Grund extrahierten wir die kontraktilen Proteine Aktin und Myosin nicht getrennt, wie dies von HASSELBACH und WEBER (1966) gefordert wird, um eine Verunreinigung mit den ATPasen granulärer Elemente zu vermeiden.

2.3.2.2. Für den histochemischen Nachweis der Myosin-ATPase verwendeten wir die Methode nach MEIJER (1970). Nach Dekapitation der Ratten entnahmen wir die Herzkammern und ließen sie schnell in Isopentan, das mittels flüssigem Stickstoff auf ca -150°C gekühlt war, tiefgefrieren. Von den Präparaten wurden 7 µ dicke Schnitte angefertigt, auf Objektträger gelegt und 5 min bei 4°C in einer wässrigen Lösung (aus 1% Formaldehyd, 2% $CaCl_2$ und 6% Dextran, durchschnittliches Mol-Gewicht 70.000) fixiert. Die fixierten Schnitte wurden 20 min bei 22°C in folgendem, frisch zubereitetem Medium inkubiert:
600 mg Gelatine gelöst in 40 ml 0,1 M Tris-Maleinsäure Pufferlösung, pH 7,2; dazu 25 mg Dinatriumadenosin-5'-Triphosphat, 3 ml 1,5% wässriges Bleinitrat, 5 ml 1% wässriges Calciumchlorid, pH 7,2.
Nach der Inkubation wurden die Schnitte in destilliertem Wasser gewaschen und das verbliebene Bleiphosphat mittels einer verdünnten wässrigen Ammoniumsulfidlösung zu schwarzem Bleisulfid umgesetzt.
Zur histochemischen Darstellung der mitochondrialen, Mg^{++}-stimulierten ATPase wurden die Herzkammern, wie oben beschrieben, geschnitten und fixiert. Entsprechend der Methode von MEIJER und VLOEDMAN (1980) erfolgte die Inkubation in einem frisch angesetzten Medium bestehend aus:
25 mg Dinatriumadenosin-5'-Triphosphat gelöst in zweifach destilliertem Wasser, dazu 20 ml Tris-Maleinsäure Puffer (0,2 M, pH 7,2), 3 ml wässriges Bleinitrat (6×10^{-2} M) und 5 ml Magnesium-Chlorid (5×10^{-2} M) in wässriger Lösung.
Zum Nachweis der oxidativen Phosphorylierung wurde die

Inkubation ohne und mit Zusatz von 2,4 Dinitrophenol (Endkonzentration im Inkubationsmedium 1×10^{-3} M) durchgeführt.

2.3.3. Statistische Auswertung

Die in den Tabellen errechneten Werte sind Mittelwerte (aus mindestens 12 Doppelbestimmungen, $n = 24$) mit ihren mittleren Fehlern. Die Signifikanzen wurden mit Hilfe des t-Testes (für ungepaarte Daten nach Student, $p < 0,05$) berechnet.

3. ERGEBNISSE

3.1. ATPasen-Aktivität in Abhängigkeit von der Giftdosis unter Antidotschutz (biochemische Bestimmung)

3.1.1. Das Aktivitätsverhalten der Na^+/K^+- ATPase (Tab. 1):

Bei DFP-Injektion bis zum Dreifachen der LD_{50} verringert sich die Aktivität der Na^+/K^+- ATPase nur geringfügig. Nach weiterer Steigerung der Giftdosis sinkt die Aktivität dann deutlich ab ($p < 0,05$). Höhere Giftmengen als das Vierfache der LD_{50} werden, trotz kombinierter Gabe von Toxogonin und Atropin, von den Ratten nicht mehr vertragen; die Tiere sterben nach wenigen Minuten.
Bei Paraoxon-Verabreichung weichen die Enzymaktivitäten bei Giftdosen bis zum Achtfachen der LD_{50} nur geringfügig von den Werten der Kontrolltiere ab und werden auch bei 16 facher LD_{50} nur leicht gehemmt.

3.1.2. Das Aktivitätsverhalten der Ca^{++}- ATPase (Tab. 1):

Bei DFP-Applikation mit Dosissteigerung auf ein Vielfaches der LD_{50} zeigt sich eine merkliche Hemmung der Aktivität der Ca^{++}- ATPase bis auf 50% der Kontrollaktivität. Schon bei Verabreichung der einfachen LD_{50} ist der Aktivitätsverlust erheblich.
Bei Paraoxon-Injektion bis zum Achtfachen der LD_{50} können keine wesentlich niedrigeren Werte als die der Ausgangsaktivität gemessen werden. Eine deutliche Aktivitätsabnahme tritt dann erst bei weiterer Verdopplung der Giftdosis auf das 16 fache ein.

3.2. ATPasen-Aktivität in Abhängigkeit von Antidoten bzw. deren Kombination bei Paraoxon-Vergiftung

3.2.1. Das Aktivitätsverhalten der Na^+/K^+- ATPase (Tab. 2):

Ausgehend von der Verabreichung einer LD_{50} Paraoxon und einer kombinierten hohen Antidotgabe ergibt sich keine Aktivitätsänderung (vgl. Tab. 1). Dies gilt auch für eine Giftdosierung vom zweifachen bzw. achtfachen der LD_{50}. Für die ausreichend hoch dosierte Kombinationstherapie weichen also bei steigenden Paraoxonkonzentrationen die Enzymwerte nicht merklich von denen der Kontrolltiere ab. Bei der kombinierten Antidotgabe, diese jedoch in der h a l b e n Dosierung (d.h. 3,75 mg/kg KG Atropin und 6,25 mg/kg KG Toxogonin), finden sich noch im Kontrollbereich liegende, leicht gehemmte Aktivitätswerte ebenfalls bis zu einer Konzentrationssteigerung auf das Achtfache der LD_{50} von Paraoxon. Auch ohne Einsatz von Atropin und Toxogonin ist bei einfacher LD_{50} eine Beeinträchtigung der Na^+/K^+- ATPase-Aktivität nicht meßbar. Bei Applikation der zweifachen LD_{50} Paraoxon und alleiniger Behandlung mit Toxogonin oder Atropin kommt es zu einem leichten Anstieg der Na^+/K^+- ATPase-Aktivität. Dieser setzt sich bei noch höherer (8 x LD_{50}) Giftdosierung und Verabreichung von jeweils einem der beiden Antidote weiter fort und beträgt dann nahezu 100%.

3.2.2. Das Aktivitätsverhalten der Ca^{++}- ATPase (Tab. 2):

Auch für die Ca^{++}- aktivierte ATPase ergibt sich nach kombinierter Antidottherapie in hoher bzw. geringer Dosierung keine Aktivitätsänderung bei einfacher LD_{50}. Ohne Antidotgabe jedoch tritt eine leichte Hemmung auf, die sich statistisch nicht sichern läßt. Bei zweifacher LD_{50} und alleiniger Behandlung mit Toxogonin bzw. Atropin halten sich die Enzymaktivitäten in Höhe des Wertes, den wir bei einfacher LD_{50} ohne Therapie messen konnten. Leicht abfallend sind auch die Aktivitätswerte bei gering dosierter Kombinationstherapie. Deutlich gehemmt werden die Aktivitäten bei achtfacher LD_{50} Paraoxon-Gabe und Einzelverabreichung der Antidote, wobei die Hemmung 50% beträgt. Nur wenig darüber liegen die Aktivitätswerte bei Kombinationstherapie in niedrigerer Dosierung, während bei ausreichend hoch dosierter kombinierter Antidotgabe kein signifikanter Unterschied zur Ausgangsaktivität besteht.

3.3. ATPasen-Aktivität in Abhängigkeit von der Vergiftungsdauer

---

3.3.1. Das Aktivitätsverhalten der Na^{+}/K^{+}- ATPase (Tab. 3):

Die Versuchsdauer mit täglicher DFP-Applikation erstreckte sich über 30 Tage. Erst ab dem 20. Tag der Vergiftung ist ein deutlicher Aktivitätsabfall ($p < 0,05$) meßbar, der bis zum 25. Vergiftungstag noch zunimmt. Am 30. Versuchstag ist keine weitere Aktivitätsabnahme zu beobachten.

Auch nach Paraoxon-Verabreichung liegen die Aktivitätswerte bis zum 15. Tag etwa gleich denen der Kontrolltiere. Erst nach 20 maliger Applikation wird eine niedrigere Enzymaktivität meßbar. Im Verlauf von weiteren 10 Tagen kommt es zu keiner zusätzlichen Aktivitätshemmung.
Bei Parathion-Injektion läßt sich wie nach Paraoxon-Applikation erst nach 20 tägiger Verabreichung eine signifikante Hemmung der Na^+/K^+- ATPase-Aktivität messen, die auch nach Ablauf von 30 Tagen nicht nennenswert zunimmt.

3.3.2. Das Aktivitätsverhalten der Ca^{++}- ATPase (Tab. 3):

Nach DFP-Injektion wird im Gegensatz zum Aktivitätsverhalten der Na^+/K^+- ATPase die Aktivität der Ca^{++}-ATPase schon nach einmaliger Applikation bis zu 25% gehemmt. Am 25. Versuchstag können nur noch 50% der Ausgangsaktivität gemessen werden, was ebenso für den 30. Gifttag gilt.
Auch bei Paraoxon-Applikation liegt die Enzymaktivität schon einen Tag nach Verabreichung deutlich unter dem Ausgangswert, jedoch noch ca 15% über dem vergleichbaren Wert nach DFP-Gabe. Die Aktivitätshemmung nimmt im Verlauf des Versuches noch zu und erreicht dann am 25. Tag mit etwa 50% der Ausgangsaktivität ein Maximum. Ein weiterer Aktivitätsverlust ist bis zum 30. Tag nicht festzustellen.
Ebenfalls ist nach Parathion-Applikation schon 24 Std. später die Aktivität der Ca^{++}- ATPase merklich gehemmt. Der Tiefpunkt der Enzymaktivität wird ähnlich wie nach DFP- und Paraoxon-Gabe nach etwa 30 Tagen erreicht.

3.4. Das Aktivitätsverhalten der mitochondrialen Mg^{++}-stimulierten ATPase nach DFP- und Paraoxon-Applikation im histochemischen Präparat

3.4.1. Herzmuskel

In Abb. 1 kommt die myofibrilläre ATPase-Aktivität in einer Querstreifung der Herzmuskelfasern zur Darstellung entsprechend ihrer Lokalisation in den Myofilamenten. ATPase-Aktivität findet sich aus diesem Grunde auch insbesondere an den kleinen Gefäßen. Die Zellkerne und die Glanzstreifen sind dagegen ATPase-negativ.

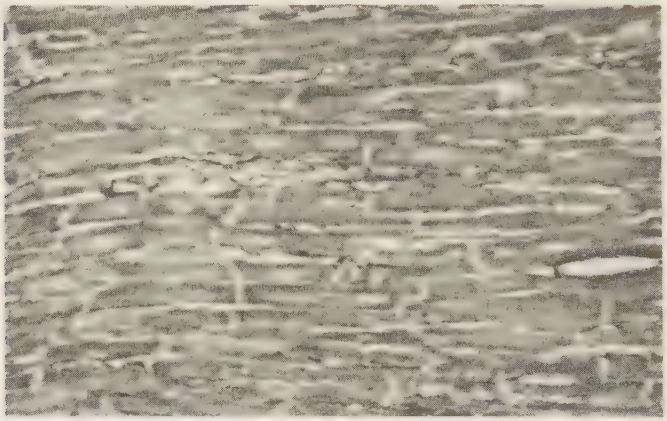

Abb. 1

Myofibrilläre ATPase-Aktivität, Herzmuskel, Ratte (240 x)

Abb. 2 zeigt vergleichsweise die Mg^{++}- stimulierbare ATPase. Auch hier findet sich eine deutlich sichtbare Aktivität über den Kapillaren, während die Herzmuskelfasern nur schwach tingiert sind. Ihre Aktivität läßt sich durch Zusatz von DNP erhöhen (vgl. Abb. 7).

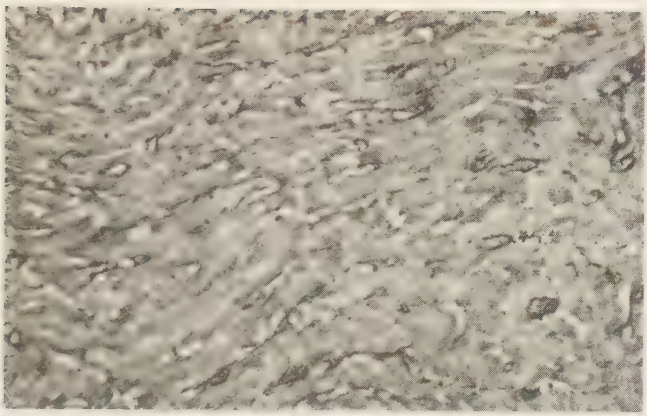

Abb. 2

Mitochondriale Mg^{++} aktivierbare ATPase-Aktivität, Herzmuskel, Ratte. Aktivität insbesondere über den Kapillaren (240 x)

Abb. 3 stellt die Mg^{++}- stimulierbare ATPase-Aktivität 25 Tage nach DFP-Applikation dar. Neben einer Verstärkung der Färbereaktion über den Fasern und den Gefäßen werden insbesondere die Zellkerne der Muskelfaser deutlich ATPase-positiv. Bei höherer Vergrößerung zeigen sich perlschnurartig angeordnete Punkte mit gesteigerter Enzymaktivität, die den in Längsrichtung der Muskelfasern liegenden Mitochondrien entsprechen (Abb. 4). Nach Paraoxon-Gaben läßt sich ein ähnliches Verhalten der mitochondrialen Mg^{++}-ATPase beobachten.

Nach einmaliger Alkylphosphat-Applikation (auch in höherer Dosierung) kann nur eine geringe Stimulierung der mitochondrialen Mg^{++}- ATPase dargestellt werden; der Kernraum zeigt niemals eine positive Reaktion.

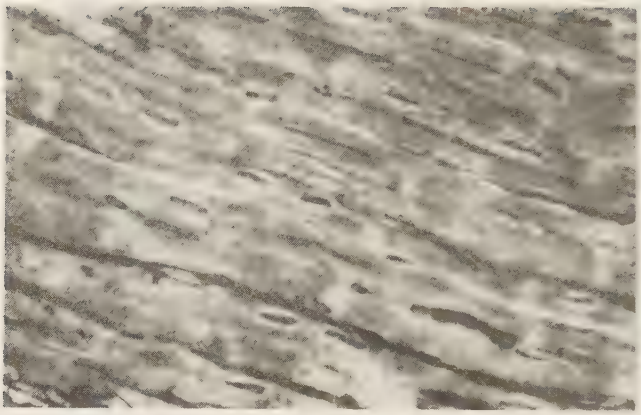

Abb. 3

Mitochondriale Mg^{++} aktivierbare ATPase-Aktivität, Herzmuskel, Ratte. 25 Tage nach täglicher DFP-Applikation erhöhte Aktivität über den Fasern, den Zellkernen und den Gefäßen (240 x)

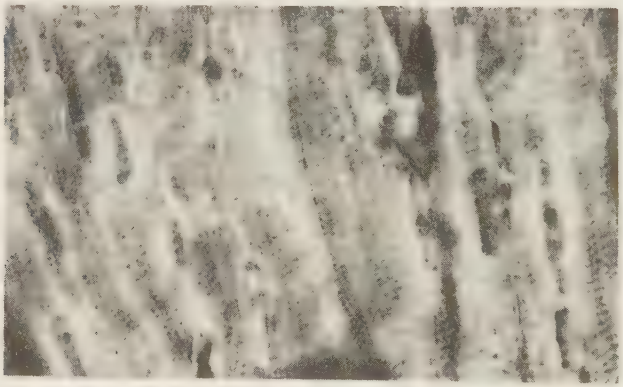

Abb. 4

Mitochondriale Mg^{++} aktivierbare ATPase-Aktivität, Herzmuskel, Ratte. Perlschnurartig angeordnete Punkte erhöhter Aktivität über den Fasern (960 x)

3.4.2. Skelettmuskel

In Abb. 5 wird an einem Muskelquerschnitt die myofibrilläre ATPase-Aktivität dargestellt. Die Intensität der Färbung ist in den Typ I-Fasern wesentlich geringer als in den Typ II-Fasern.

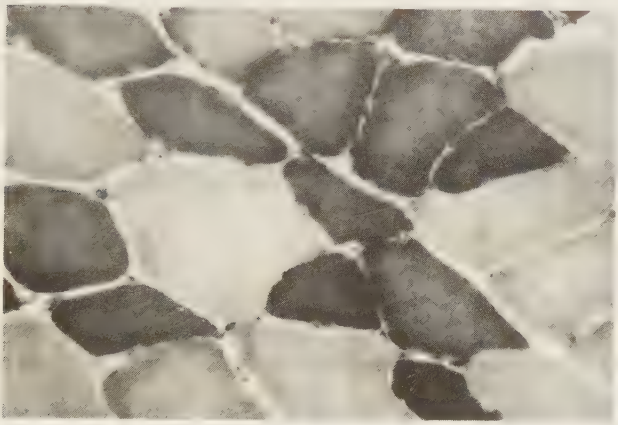

Abb. 5

Myofibrilläre ATPase-Aktivität, Musculus quadriceps, Ratte. Hohe Aktivität in den Typ II-Fasern (380 x)

In Abb. 6 zeigt die mitochondriale Mg^{++}- stimulierte ATPase eine sehr schwache Aktivität, die durch DNP beträchtlich erhöht werden kann (Abb. 7). Die aeroben Fasern weisen eine höhere DNP-stimulierbare Aktivität als die anaeroben Fasern auf. Punktartig sehr hohe Enzym-Aktivität findet sich in den Mitochondrien. Die DNP-stimulierbare ATPase-Aktivität wird durch Zusatz von Oligomycin zum Inkubationsmedium gehemmt (Präparat ähnlich dem von Abb. 6).

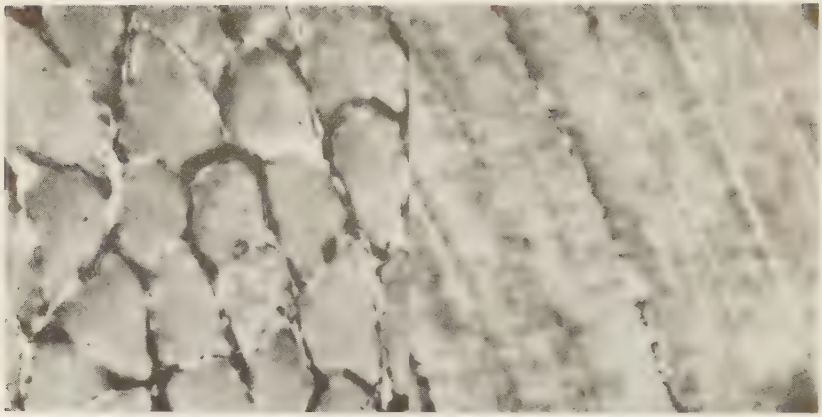

Abb. 6

Mitochondriale Mg^{++} aktivierbare ATPase-Aktivität, M. quadriceps, Ratte. Querschnitt der Fasern mit z.T. hoher Aktivität in den Faserrandpartien. Längsschnitt der Fasern mit Aktivität nur in den Kapillaren (240 x)

Abb. 7

Mitochondriale Mg^{++} stimulierbare ATPase-Aktivität, M. quadriceps, Ratte. Hohe Aktivität einzelner Fasern nach DNP (10^{-4} M)-Zugabe. Punktartig erhöhte Aktivität in den Mitochondrien (380 x)

Zu Abb. 8: Mitochondriale Mg^{++} aktivierbare ATPase-Aktivität, M. quadriceps, Ratte. 25 Tage nach täglicher DFP-Appllkation hohe Aktivität über den meisten Fasern, oft verstärkt an den Faserrandpartien (380 x)

Zu Abb. 9: Mitochondriale Mg^{++} aktivierbare ATPase-Aktivität, M. quadriceps, Ratte. Streifig hohe Aktivität über den Fasern (960 x)

25 Tage nach DFP-Applikation kommt es ebenfalls zu einer erheblichen Steigerung der Mg^{++}- stimulierten ATPase-Reaktion (Abb. 8). Die Aktivierung dieser Mg^{++}- ATPase läßt sich bei starker Vergrößerung eines Muskellängsschnittes den Mitochondrien zuordnen (Abb. 9). Nach Zusatz von DNP kann dieser Effekt noch verstärkt werden. Die meisten Fasern sind, bis auf einige nicht bzw. minimal gefärbte, fast einheitlich dunkel, wobei sich die Muskelfaser-Randpartien oft noch intensiver tingiert darstellen. Ein ähnliches Verhalten der mitochondrialen ATPase kann auch nach subchronischer Paraoxon-Applikation beobachtet werden.
Nach einmaliger Verabreichung von DFP oder Paraoxon in höherer (2 x LD_{50} bzw. 8 x LD_{50}) Dosierung kann eine Aktivitätsstimulierung nicht bzw. nur geringfügig erreicht werden. Von dieser werden insbesondere die Mitochondrien betroffen.

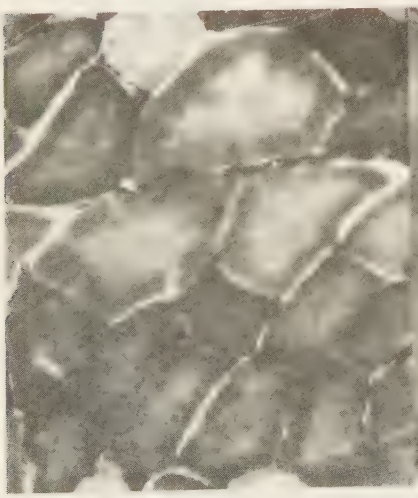

Abb. 8

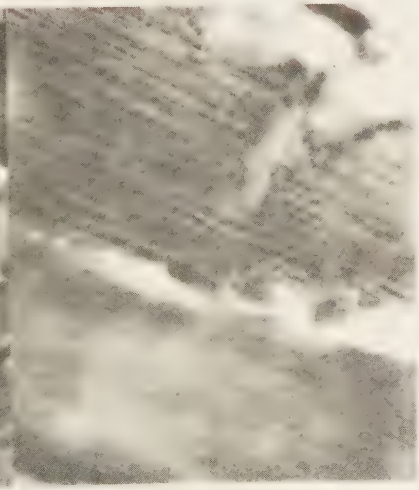

Abb. 9

	DFP		Paraoxon	
Dosis	Ca^{++}- ATPase	Na^+/K^+- ATPase	Ca^{++}- ATPase	Na^+/K^+- ATPase
1 x LD_{50}	63,1 ± 2,8 *	94,0 ± 7,9	98,0 ± 6,1	99,7 ± 6,6
2 x LD_{50}	61,3 ± 3,4 *	94,8 ± 4,5	98,3 ± 4,5	96,7 ± 4,1
3 x LD_{50}	58,7 ± 2,5 *	91,2 ± 6,0	97,3 ± 5,1	97,1 ± 2,9
4 x LD_{50}	51,2 ± 3,1 *	76,7 ± 4,5 *	95,5 ± 3,6	94,6 ± 3,8
8 x LD_{50}			94,9 ± 4,3	98,6 ± 6,6
16 x LD_{50}			83,5 ± 4,6 *	92,5 ± 4,8

* $p \leq 0,05\%$

Tab. 1: In vivo Aktivität der Na^+/K^+- und der Ca^{++}- stimulierten ATPasen (in % der Aktivität von unbehandelten Tieren) aus Herzkammern(-Homogenat) von Ratten 24 h nach Applikation von DFP bzw. Paraoxon in steigender Dosierung unter Antidotschutz

Antidote (mg/kg KG)	Ca^{++}- ATPase			Na^{+}/K^{+}- ATPase		
	Paraoxon			Paraoxon		
	1 x LD_{50}	2 x LD_{50}	8 x LD_{50}	1 x LD_{50}	2 x LD_{50}	8 x LD_{50}
ohne	89,9 ± 6,3			96,9 ± 6,4		
Toxogonin (12,5)	92,1 ± 3,7	84,6 ± 5,4*	49,4 ± 5,4*	97,3 ± 4,9	112,2 ± 5,5	192,0 ± 2,4*
Atropin (7,5)	94,8 ± 5,8	90,7 ± 2,8	50,1 ± 3,0*	96,9 ± 5,5	112,4 ± 7,6	196,7 ± 2,8*
Toxogonin (12,5) + Atropin (7,5)	98,0 ± 6,1	98,3 ± 4,1	94,9 ± 4,3	99,7 ± 6,6	96,7 ± 4,1	98,6 ± 6,6
Toxogonin (6,25) + Atropin (3,75)	97,4 ± 2,1	92,3 ± 8,5	59,1 ± 1,3*	97,6 ± 5,2	92,8 ± 5,4	88,7 ± 4,9*

* $p < 0,05\%$

Tab. 2: In vivo Aktivität der Na^{+}/K^{+}- und der Ca^{++}- stimulierten ATPase (in % der Aktivität von unbehandelten Tieren) aus Herzkammern(-Homogenat) von Ratten 24 h nach Paraoxon-Applikation mit verschiedenen Antidot-Gaben

Anzahl der Intoxikations-tage	DFP		Paraoxon		Parathion	
	Ca^{++}- ATPase	Na^+/K^+-ATPase	Ca^{++}-ATPase	Na^+/K^+-ATPase	Ca^{++}-ATPase	Na^+/K^+-ATPase
1	71,3 ± 3,6*	92,7 ± 3,6	87,9 ± 3,7*	97,0 ± 6,2	89,6 ± 4,7	96,8 ± 3,2
5	63,8 ± 2,3*	94,0 ± 8,6	83,0 ± 7,5*	99,2 ± 5,0		
10	59,3 ± 2,1*	94,1 ± 5,0	64,9 ± 4,2*	99,8 ± 5,3	74,7 ± 5,1*	96,3 ± 4,1
15	58,9 ± 2,5*	93,1 ± 6,5	59,7 ± 3,4*	94,4 ± 5,3		
20	53,8 ± 3,1*	81,9 ± 4,9*	53,3 ± 3,1*	86,2 ± 2,3*	59,9 ± 6,7*	87,8 ± 5,4*
25	49,7 ± 4,3*	76,1 ± 3,8*	50,7 ± 4,1*	86,1 ± 3,1*		
30	50,3 ± 3,6*	75,8 ± 4,1*	50,8 ± 6,4*	85,7 ± 2,9*	51,7 ± 5,9*	85,2 ± 6,1*

* $p < 0,05\%$

Tab. 3: In vivo Aktivität der Na^+/K^+- und der Ca^{++}- stimulierten ATPasen (in % der Aktivität von unbehandelten Tieren) aus Herzkammern(-Homogenat) von Ratten 24 h nach Beendigung einer über Tage reichenden Applikation von DFP, Paraoxon und Parathion

4. DISKUSSION

Die Pathogenese von Alkylphosphat-Intoxikationen erklärt sich im wesentlichen aus der Hemmung der Acetylcholinesterase an den cholinergen Nervenenden, die zu einer endogenen Acetylcholin-Anhäufung führt. Pharmakologisch werden muskarinartige Wirkungen an den postganglionären parasympathischen Rezeptoren von nikotinartigen Effekten an den vegetativen Ganglien und motorischen Endplatten unterschieden. Außerdem kommt es zu zentralnervösen Erregungs- und schließlich Lähmungserscheinungen, wobei in unbehandelten Fällen eine Atemlähmung in der Regel die Todesursache darstellt (Übersicht bei ERDMANN und LENDLE 1958). Kardiotoxische Symptome in Folge einer Alkylphosphat-Vergiftung können durch endogene ACh-Konzentrationserhöhung, durch Hypoxie aufgrund einer Atemlähmung und vermutlich auch durch direkte Wirkung auf die ATPasen selbst ausgelöst werden.

Die direkte kardiotoxische Wirkung der Alkylphosphate kommt, wie in tierexperimentellen Versuchen gezeigt wurde, in einer Erregungsbildungs- und Erregungsleitungsstörung (BURN et al. 1955; HEERING 1970) sowie in einer Verminderung der Kontraktilität bis zum Herzversagen (LOOMIS und SALAFSKY 1964; WOLTHUIS und MEETER 1968) zum Ausdruck. Da sich diese Vergiftungseffekte nicht durch symptomatische und kausale Behandlung beheben lassen, schließen die oben genannten Autoren auf eine mögliche Beeinflussung oder sogar Hemmung transmembranöser Prozesse, die durch membrangebundene A T P a s e n aufrecht erhalten werden

(DIPALMA et al. 1970). Bei den bisherigen Untersuchungen zum Verhalten der ATPasen-Aktivität nach Phosphatester-Applikation traten jedoch Differenzen in den Ergebnissen auf, die auf unterschiedliche methodische Ansätze zurückzuführen sein dürften. Während alle in vitro Versuche unabhängig vom verwendeten Organophosphat eine Hemmung der Na^+/K^+- ATPase-Aktivität aufweisen (SACHS und HIRSCHOWITZ 1965; HOKIN et al. 1966; SACHS et al. 1969; DIPALMA et al. 1970; JOVIC et al. 1971; BROWN und SHARMA 1976; HETTWER 1981), ist in vivo der Aktivitätsgrad von der Zeitdauer der Intoxikation und der injizierten Giftmenge abhängig. So konnte nach akuter Soman- bzw. Paraoxon-Applikation an Niere und Pankreas der Ratte von HETTWER (1975 und 1977) eine Aktivitätshemmung nachgewiesen werden, während nach DFP-Gabe an Mäuse- und Ratten-Leber, -Niere und -Gehirn von JOVIC et al. (1971) und RAMACHANDRAN (1967) keine Abweichung von der Ausgangsaktivität zu beobachten war und sich bei chronischer DFP-Applikation an Ratten-Niere und -Gehirn sogar eine Aktivitätserhöhung ergab (GLOW et al. 1972). Für eine Aktivitätsänderung in vivo wie in vitro sind relativ hohe Giftdosierungen (MURTHA und WILLS 1963) bzw. eine chronische Verabreichung (GLOW et al. 1972) Voraussetzung, um ausreichende Giftkonzentrationen im Gewebe zu erreichen.

An Hand unserer biochemischen in vivo Befunde zum Aktivitätsverhalten der Herz-ATPasen kann die oben dargestellte Abhängigkeit der Aktivitätsänderung bei biochemischem Nachweis zusätzlich noch um die Art des verabreichten Phosphorsäureesters und um die Spezifität der zu hemmenden

ATPase erweitert werden. Es ergibt sich bei den untersuchten ATPasen zum ersten eine deutlich höhere Hemmung nach Zufuhr von DFP gegenüber Paraoxon- oder Parathion-Applikation und zum zweiten eine stärkere Inhibierung der kontraktilen ATPase im Vergleich zur Transport-ATPase. Auffallend ist, daß die ATPasen im akuten wie auch im subchronischen Versuch nur bis zu einem gewissen Aktivitäts-Grenzwert zu blockieren sind. So ließ sich im subchronischen Versuch die Ca^{++}- aktivierte ATPase bis zu 50% durch DFP, Parathion und Paraoxon hemmen, während die Na^{+}/K^{+}-ATPase durch DFP am stärksten, aber nur um etwa 25%, in ihrer Aktivität beeinträchtigt wurde. Im akuten, dosisabhängigen Versuch unter Antidotschutz inhibiert DFP die Aktivität dieser ATPasen ähnlich wie nach subchronischer Applikation, während durch Paraoxon die myofibrilläre ATPase nur minimal und die Transport-ATPase nicht signifikant in ihrer Aktivität gemindert werden. Wie den Tabellen zu entnehmen ist, hemmt DFP im akuten Versuch mit steigender Giftdosierung sowie im subchronischen Vergiftungsfall die untersuchten ATPasen am deutlichsten. Dies könnte darauf zurückgeführt werden, daß DFP aufgrund seiner lipophilen Eigenschaften eine höhere Konzentration in den Organen, so auch im Herzen, zu erreichen vermag (FREDERICKSON und BIGELOW 1961; RAMACHANDRAN 1966; HETTWER 1981). Zusätzlich dürften im subchronischen Vergiftungsfall noch die Fluorid-Ionen eine hemmende Wirkung ausüben (SACHS et al. 1969; AKERA 1981), während im akuten Versuch mit steigender Giftdosierung die höhere Alterungsgeschwindigkeit des DFP-AChE-Komplexes (ERMANN

1969) gegenüber dem entsprechenden Paraoxon-Komplex - und damit die geringere Wirksamkeit der Antidottherapie - zu der deutlichen Differenz in der Hemmwirkung dieser beiden Alkylphosphate geführt haben könnte. Die geringe Inhibierung der ATPasen durch Paraoxon bei Antidotgabe veranlaßte uns, den möglichen Einfluß von Atropin und Toxogonin in Kombinations- und Einzelgabe auf die Höhe der Enzymaktivität zu ermitteln. Hierbei zeigte sich nun, daß die halbe Konzentration der Antidote nach achtfacher LD_{50}-Gabe von Paraoxon eine signifikante Hemmung der Aktivität der Na^+/K^+- ATPase - vergleichbar mit der im subchronischen Versuch - hervorrief, für die Ca^{++}- stimulierte ATPase jedoch eine etwa 40%ige Aktivitätsminderung zur Folge hatte. Bei Verabreichung von Toxogonin bzw. Atropin a l l e i n ergab sich hingegen für die Na^+/K^+- ATPase eine fast 100%ige Aktivitätssteigerung, während bei der Ca^{++}- stimulierten ATPase die Aktivität um 50% wie in den subchronischen Versuchen nach DFP-Applikation zurückging. Damit dürfte ein Einfluß der Antidote auf die Höhe der Aktivitätsänderung zumindest für Paraoxon nachgewiesen sein.

Neben der direkten Beeinflussung der ATPasen-Aktivität können als Ursache für die kardiotoxischen Symptome einer Alkylphosphat-Vergiftung auch die endogene ACh-Konzentrationserhöhung und die durch Atemlähmung bedingte Hypoxie in Frage kommen.

Die endogene ACh-Akkumulation bewirkt einen erhöhten Vagotonus, der durch die Erregung der sympathischen Ganglien und des Nebennierenmarks mit daraus resultierender hoher Katecholaminausschüttung noch gesteigert werden

kann. Dies führt zu Sinusbradykardien und AV-Überleitungsstörungen bis hin zum totalen AV-Block mit Kammerbradykardien (PASI und LEUZINGER 1970; NAMBA et al. 1970; NAMBA 1971; ENGEL et al. 1974; OKONEK 1975).

Der Sauerstoffmangel ruft eine myokardiale Schädigung hervor, die sich in interatrialen und atrio-ventrikulären Überleitungsstörungen zeigt (von CLARMANN 1966; von GAISBERG und DIETERLE 1967; PRINZ 1967; KLEMM et al. 1968; NAMBA et al. 1970; HEERING 1970). Die atmungsbedingte Hypoxie kann weiterhin durch koronare Minderdurchblutung (HAHN 1956) bzw. durch Störung der Mikrozirkulation (GROMOV und ROZENGART 1976) aufgrund einer Hyperkoagulabilität (GROB 1963; HOLMES 1974) verstärkt werden. ACh-Akkumulation wie auch Hypoxie rufen darüber hinaus Elektrolytverschiebungen - durch veränderte Membranpermeabilität - hervor, die im akuten Vergiftungsfall zunächst mit einer Hyperkaliämie (HEERING 1970), im weiteren Verlauf dagegen mit einer Hypokaliämie (KLEMM et al. 1968; BARCKOW et al. 1969; BOELCKE et al. 1970; LÜDERITZ et al. 1974) einhergehen können. Die beobachteten Erregungsrückbildungsstörungen werden hiermit in Zusammenhang gebracht.

In unseren histochemischen Präparaten läßt sich im Gegensatz zu unseren biochemischen Ergebnissen keine Abhängigkeit der mitochondrialen ATPase-Aktivität vom verabreichten Organophosphat nachweisen; die Abhängigkeit von der Zeitdauer der Intoxikation wird jedoch bestätigt. So zeigt sich im akuten Versuch - sowohl bei DFP- als auch bei Paraoxon-Verabreichung - nur eine geringfügige Änderung der Mg^{++}- stimulierten ATPase-Aktivität, während nach 25 maliger Organophosphat-Applikation es zur deutlichen Aktivitätssteigerung als Ausdruck einer zunehmend eingeschränkten oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien kommt.

Die Ergebnisse unserer in vivo Versuche lassen sich danach im Einzelnen in folgender Weise deuten:
Im akuten Versuch bei sehr hoher Giftdosierung unter Antidotschutz scheint die Aktivitätsbeeinflussung von vielfältigem Geschehen zu sein. Die von BETHE et al. (1957); ELIAKIM et al. (1961); KRAUSE et al. (1970) nachgewiesene Bradykardie und verminderte Kontraktilität gehen nach BARANY (1967); BÜCHNER und ONISHI (1970) mit verringerter Aktivität der myofibrillären ATPase einher, die Folge des erhöhten ACh-Spiegels sein dürfte. Zudem könnten durch das vermehrte ACh die Enzymaktivitäten aufgrund einer veränderten Permeabilität für K^+ beeinflußt werden. Die Permeabilitätsänderung führt zu einem gesteigerten K^+- Ausstrom in die Extrazellulärräume, d.h. zu einer akuten Hyperkaliämie, die im weiteren Verlauf der Vergiftung durch erhöhte K^+-Exkretion der Nieren in eine Hypokaliämie übergeht (KLEMM et al. 1968; BARCKOW et al. 1969; BOELCKE et al. 1970; LÜDERITZ et al. 1974). Entsprechend zeigt sich im EKG zunächst ein Kirchturm-T (HEERING 1970), später dann eine TU-Verschmelzungswelle (ENGEL et al. 1974).
Von besonderer Bedeutung scheinen jedoch nach Alkylphosphat-Vergiftung die sich aus der Atem- und Kreislaufinsuffizienz ergebenden Hypoxien zu sein (HAHN 1956; ERDMANN und LENDLE 1958; NAMBA et al. 1970; OKONEK 1975; GROMOV und ROZENGART 1976). Denn schon nach kurzzeitigen hypoxischen Zuständen werden ultrastrukturelle Veränderungen insbesondere an den Mitochondrien sichtbar (HETTWER 1975). Wie von vielen beschrieben (HASPER 1964; JENNINGS et al.

1969; BÜCHNER und ONISHI 1970) treten auch am Herz- und am Skelettmuskel Mitochondrienschwellung, Matrixaufhellung und Cristolyse auf. Die Destruktion der Mitochondrienmembranen beeinträchtigt insbesondere die an diesen ablaufende oxidative Phosphorylierung, durch deren Entkopplung es zu einer Steigerung der Aktivität der mitochondrialen, Mg^{++}- stimulierten ATPase kommt, wie sich an Hand der histochemischen Bilder nachweisen läßt.

Morphologische, bio- und histochemische Untersuchungen an Skelettmuskeln und isolierten Mitochondrien erbrachten eine Differenzierung verschiedener Mitochondrien-Populationen (HÜLSMANN et al. 1970; MEZON et al. 1974). Die einen reagieren bei krankhaften Prozessen der Muskelfasern oder Einwirkung pathogener Noxen auf dieselben schnell mit Strukturumbauten und Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung, die anderen sind strukturell relativ stabil; sie zeigen keine morphologischen Veränderungen und haben eine weiterhin funktionierende Zellatmung (HÜLSMANN et al. 1967; MEIJER und VLOEDMAN 1980). So sind nach einmaliger Applikation von DFP bzw. Paraoxon nur punktartige Aktivitätssteigerungen über den Muskelfasern zu erreichen, woraus zu schließen wäre, daß nur wenige Mitochondrien von der Entkopplung betroffen sind. Auch bei Verabreichung höherer Alkylphosphat-Konzentrationen werden nur relativ wenige Mitochondrien destruiert, andere schwellen zwar an, regenerieren aber innerhalb von einigen Tagen wieder (HETTWER 1981). Entsprechend zeigt sich in unseren histochemischen Bildern nur eine geringe Zahl von Muskelfasern mit den Zeichen einer erhöhten ATPase-Aktivität. Folgen

der Hypoxie sind neben einer Senkung der oxidativen Phosphorylierung und einem damit bedingtem Energiemangel nach ITO und CHIDSEY (1972) auch ein erhöhter Ca^{++}- Gehalt der Mitochondrien. Ansteigende intramitochondriale Ca^{++}- Mengen jedoch führen, neben einer weiteren Einschränkung der Phosphorylierung (BRAUNWALD et al. 1976), zu einem verminderten Angebot an Ca^{++} für die Myofibrillen. Letzteres ist zudem aufgrund eines reduzierten Ca^{++}-Einstroms in die (Herz-)Muskelzelle selbst herabgesetzt; dies kann die Folge von Strukturänderungen am Sarkolemm (z.B. DRANSFELD und LIPINSKI 1973; BRAUNWALD et al. 1976; vgl. GERICKE et al. 1976) und am sarkoplasmatischen Retikulum (ITO et al. 1974) sein. Damit steht für die Myofilament-Kopplung nicht genügend freies Ca^{++} zur Verfügung. Entsprechende Bindungsstellen am Troponin-Molekül können darüber hinaus durch H^{+}- Ionen blockiert werden, die sich aufgrund einer metabolischen Azidose (DOMSCHKE et al. 1971; PRINZ 1967 und 1969; BARCKOW et al. 1969; BOELCKE et al. 1970) bei Alkylphosphat-Vergiftung in den Zellen anhäufen (KATZ und HECHT 1969). Dadurch kommt es zu einer Kontraktionsschwäche des Herzmuskels (NAYLER 1967; BARANY 1967; BÜCHNER und ONISHI 1970), deren Ursache letztlich der gestörte Atmungsstoffwechsel mit Einschränkung der atmungsgekoppelten Energiebildung ist (s. DOMSCHKE et al. 1971). Die mangelnde Kontraktilität kann also nicht nur, wie von WOLTHUIS und MEETER (1968) postuliert, als Folge der direkten kardiotoxischen Wirkung der Alkylphosphate angesehen werden, sondern ist akut, bei hoher Dosierung ebenso auf die Anoxie histotoxischer,ischämischer und

hypoxischer Genese zurückzuführen.

Auch bei den Vergiftungsreihen mit v a r i i e r e n - d e r A n t i d o t g a b e sind multifaktorielle Ursachen für die Beeinflussung der ATPasen-Aktivität anzunehmen. So ist bekannt, daß schon geringfügige Verteilungsstörungen der K^+- Ionen Veränderungen der Herzfunktion hervorrufen. Eine veränderte K^+- Permeabilität mit vermehrtem Ausstrom von K^+- Ionen wird durch das erhöhte (endogene) ACh-Angebot und die akute Hypoxie am Herzmuskel nach Alkylphosphat-Intoxikation (HUTTER und HARRIS 1956) verursacht. Daraus resultiert extrazellulär eine erhöhte K^+- Konzentration mit sofortigem Sistieren des raschen Na^+- Einstroms in die Zelle, woraus sich ein verringertes Membranpotential mit Schlagfrequenzabnahme ergibt (BRAUNWALD et al. 1976; KATZ 1977). Ferner induziert eine extrazellulär erhöhte K^+- Konzentration nach PRASAD (1976) eine Aktivierung der Na^+/K^+- Pumpe mit Abnahme der Kontraktilität des Herzmuskels. Das vermehrte ACh führt darüber hinaus auch zu einem Anstieg des Adrenalin-Spiegels (OKONEK 1977), so daß es dennoch, wenn auch verzögert, zu einem vermehrten Na^+- Einstrom in die Herzmuskelzelle kommt. Beide Mechanismen, nämlich die erhöhte K^+- Permeabilität und der durch Adrenalin bedingte Na^+- Einstrom, aktivieren die Na^+/K^+- ATPase des Sarkolemms (BRODAL et al. 1975) und ergeben den von uns gemessenen Aktivitätsanstieg nach alleiniger Toxogonin- bzw. Atropin-Therapie. Bei optimalem Angebot der Antidote jedoch - in den vorliegenden Experimenten in Form einer Kombinationsbehandlung - vermuten wir durch ausreichende AChE-

Reaktivierung und kompetitive Besetzung der ACh-Rezeptoren eine weitgehende Aufhebung der muskarinartigen wie auch der nikotinartigen Wirkung des ACh. Auf diese Weise kann die Membranpermeabilität für K^+- und Na^+- Ionen auf dem Ausgangswert gehalten werden, was gleichbleibende Aktivität der Transport-ATPase bedeutet. Wir sehen deshalb die Wirkung von Toxogonin und Atropin auf das Herz als indirekt an. Toxogonin wirkt bekanntlich durch (partielle) Reaktivierung der AChE, während Atropin bevorzugt die muskarinähnlichen Wirkungen des ACh durch Besetzung der ACh-Rezeptoren antagonisiert.

Für die kontraktilen ATPasen jedoch ist eine Verminderung ihrer Aktivität trotz Toxogonin- bzw. Atropin-Gaben allein wie auch nach geringer Dosierung einer Kombinationstherapie zu beobachten. Vermutlich ist die Aktivitätsminderung auf reduzierten Ca^{++}- Einstrom in die Herzmuskelzelle mit den oben beschriebenen Folgen zurückzuführen, wobei eine Schädigung des Sarkolemms durch Strukturumbauten (vgl. GERICKE et al. 1976; HETTWER und GERICKE 1977) wie auch die Hypoxie als Ursache in Frage kommen. Des weiteren wäre die Inhibierung der SH-Gruppen (s. Einleitung S. 2) am Enzym z.B. durch Paraoxon bei der Aktivitätshemmung in Erwägung zu ziehen.

Im s u b c h r o n i s c h e n V e r s u c h , also bei mehrmaliger Verabreichung subletaler Organophosphatmengen, könnte wiederum der sich unter diesen Bedingungen bildende erhöhte ACh-Spiegel von Bedeutung sein. Es hat sich jedoch gezeigt, daß bei anhaltend hoher ACh-Konzentration im Synapsenspalt eine Toleranzentwicklung der cholinergen

Rezeptoren gegenüber dem Transmitter festzustellen ist (RIDER et al. 1952; BRODEUR und DUBOIS 1964; vgl. CHANG et al. 1973). Kaum eine Rolle dürfte dabei die hypoxisch oder ischämisch bedingte Anoxie spielen, da dann eine frühzeitigere Änderung der Enzymaktivität zu erwarten wäre. Wesentlich scheinen jedoch Elektrolytverschiebungen mit Beeinträchtigung der Energiebildung zu sein. Diese ergeben sich neben den schon erwähnten Strukturumbauten der Plasma- und Mitochondrienmembranen - die in histochemischen Präparaten sichtbar werden - möglicherweise auch aufgrund einer direkten ATPasen-Inaktivierung. Eine solche Inaktivierung kann, wie oben beschrieben, durch Bindung des Alkylphosphates an die an den ATPasen vorhandenen freien reaktiven SH-Gruppen oder durch Interaktion des Esters mit dem Serin direkt im aktiven Zentrum des Enzyms zustande kommen. Eine direkte, auf einer SH-Gruppen-Inaktivierung beruhende Wirkung ist vor allem bei der myofibrillären ATPase anzunehmen (SEKINE et al. 1962; SEIDEL 1969; REISLER et al. 1974). Für die Transport-ATPase ist bislang nur von LAHIRI und WILSON (1970) eine Reaktion der Phosphorsäureester mit SH-Gruppen erwogen worden, während von anderen Autoren eine Reaktion mit dem Serin im aktiven Zentrum vermutet wird (vgl. OOSTERBAAN und COHEN 1964; HOKIN et al. 1966; SACHS et al. 1969). Wegen der geringen Affinität der Organophosphate zu den Phosphohydrolasen benötigt die Komplexbildung eine längere Reaktionszeit, so daß erst bei mehrtägiger Applikation - dies auch bei geringer Giftdosierung - eine Aktivitätsbeeinflussung ergeben kann. Entsprechend wird in unseren histo-

chemischen Präparaten auch im Verlaufe von mehreren Tagen eine deutliche Änderung der mitochondrialen Enzymaktivität sichtbar.
Die sich aus der teilweisen Hemmung der Transport-ATPase ergebenden ionalen Umverteilungen könnten zusätzlich auf die myofibrilläre ATPase einwirken, woraus sich unter Umständen die erhöhte Aktivitätsbeeinflussung der Ca^{++}-stimulierten ATPase im Vergleich zur Na^{+}/K^{+}- ATPase erklären ließe.
Der wohl entscheidende Grund, warum die Herzmuskelzelle bei längerer Alkylphosphat-Gabe in einen Energiemangel gerät, dürfte in der Entkopplung der oxidativen Phosphorylierung zu sehen sein. Ähnlich wie durch DNP kommt es nach subchronischer Alkylphosphat-Intoxikation zu einer Stimulierung der mitochondrialen Mg^{++}- ATPase-Aktivität, wie sich an Hand unserer histochemischen Untersuchungen belegen läßt (s. Abb. 3,4,7,8 und 9). Parallel dazu lassen sich an den Mitochondrien pathologische Strukturumbauten, wie sie oben beschrieben wurden, nachweisen. Im weiteren Verlauf werden die geschädigten Mitochondrien dann durch lysosomale Enzyme abgebaut.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß für die Folgen der akuten Alkylphosphat-Vergiftung am Herzen bei ausreichend dosierter Antidotgabe in erster Linie die Hypoxie verantwortlich gemacht werden kann, ebenso aber auch der schnell ansteigende ACh-Spiegel; die direkte Wirkung auf die ATPasen-Aktivität scheint von untergeordneter Bedeutung zu sein.

Im akuten Geschehen, bei Einzeltherapie mit Toxogonin bzw.

Atropin, stehen bei der Beeinflussung der Na^+/K^+- ATPase die sich durch Hypoxie und ACh-Anhäufung ergebenden Elektrolytverschiebungen im Vordergrund des Vergiftungsgeschehens, während die Ca^{++}- stimulierte ATPase im wesentlichen durch Hypoxie und die daraus resultierende veränderte Ca^{++}-Verteilung beeinträchtigt werden dürfte. Die beiden letzt genannten Faktoren schränken gleichzeitig auch die ATP-Bildung ein, die eine abgeschwächte Muskelkontraktion zur Folge hat (SEAGREN et al. 1971; YAZAKI et al. 1979).

Im subchronischen Vergiftungsfall hingegen sind vermutlich die direkte ATPasen-Inaktivierung, die Störung der oxidativen Phosphorylierung und der sich daraus ergebende Energiemangel mit verminderter Kontraktilität wesentlich für eine Insuffizienz des Herzmuskels, da entsprechende hypoxische Zustände wie im akuten Vergiftungsgeschehen nicht eintreten und es gegenüber der erhöhten ACh-Konzentration auf die Dauer zu einer Toleranzentwicklung kommen kann.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde die Wirkung von den Organophosphaten DFP, Paraoxon und Parathion auf die Aktivität einiger ATPasen des Rattenherzens nach in vivo Applikation untersucht.
Mit Hilfe biochemischer und histochemischer Bestimmungsmethoden wurden die Aktivitäten der Transport-ATPase, der myofibrillären und der mitochondrialen ATPase bei akuter Organophosphatverabreichung in ansteigender Dosierung unter Antidotschutz und bei subchronischer Gabe verfolgt. Sowohl DFP als auch Paraoxon und Parathion wirken in diesen Versuchen hemmend auf die Enzymaktivitäten, wobei an Hand unserer biochemischen Messungen auf eine Abhängigkeit der Aktivitätsänderung von der Vergiftungsdauer sowie von der Konzentration und von der Art des verwendeten Alkylphosphates geschlossen werden kann.
DFP übt jeweils den größten Einfluß aus, wobei der Umfang der Aktivitätshemmung bei den untersuchten ATPasen recht verschieden ist. So reagiert die Ca^{++}- stimulierte ATPase empfindlicher als die Na^{+}/K^{+}- ATPase auf die Zugabe von Alkylphosphaten. Darüber hinaus erweist sich jedoch auch die Art der Antidottherapie als wesentlich für den Grad der Aktivitätsbeeinflussung. So vermag die üblicherweise verwendete Kombinationsbehandlung mit Atropin (7,5 mg/kg KG) und Toxogonin (12,5 mg/kg KG) die ATPasen am besten vor der Wirkung der Organophosphate zu schützen. Dagegen läßt sich bei geringer dosierter Antidotkombination wie auch bei Einzelgabe von Atropin bzw. Toxogonin für die Na^{+}/K^{+}- ATPase ein deutlicher

Aktivitätsanstieg und für die Ca^{++}- stimulierte ATPase ein signifikanter Abfall nachweisen. Die Aktivitätsveränderungen sind Folge der vielfältigen Wirkungsmechanismen der Phosphorsäureester. Als wesentlich können dabei die Hypoxie, die erhöhte ACh-Menge, Elektrolytverschiebungen und auch eine direkte Beeinflussung der Enzyme über SH-Gruppen angesehen werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

AKERA,T., Cardiac glycosides. In: Handbook of experimental pharmacology, vol. 56/1, (ed. K. Greeff). Springer, Berlin, Heidelberg, New York 1981

BARANY,M., CONOVER,T.E., SCHLISELFELD,L.H., GAETJENS,E. and GOFFART,M., Relation of properties of isolated myosin to those of intact muscles of the cat and sloth. Europ. J. Biochem. 2, 156-164 (1967)

BARCKOW,D., NEUHAUS,G. und ERDMANN,W.D., Zur Behandlung der schweren Parathion-(E 605-)Vergiftung mit dem Cholinesterase-Reaktivator Obidoxim (Toxogonin). Arch. Toxicol. 24, 133-146 (1969)

BETHE,K., ERDMANN,W.D., LENDLE,L. und SCHMIDT,G., Spezifische Antidotbehandlung bei protrahierter Vergiftung mit Alkylphosphaten (Paraoxon, Parathion, DFP) und Eserin an Meerschweinchen. Arch. Exp. Path. Pharmacol. 231, 3-22 (1957)

BOELCKE,G., FEISE,G., DE CASSAN,K. und KEYSER,E., Der Einfluß der Vergiftung durch Alkylphosphate und der spezifischen Antidottherapie auf die Leberfunktion von Ratten und Kaninchen. Arzneim. Forsch. (Drug Res.) 20, 770-774 (1970)

BRAUNWALD,E., ROSS,J. and SONNENBLICK,E.H., Mechanism of contraction of the normal and the failing heart, 2nd ed., Little Brown Comp., Boston 1976

BRODAL,B.P., EEK-LARSEN,N.L., IVERSEN,O.-J.E., JEBENS,E. and RØED,A., Enhanced (Na^+/K^+)-activated ATPase activity after indirect electric stimulation of rat skeletal muscle in vivo. Life Sci. 17, 329-331 (1975)

BRODEUR,J. and DUBOIS,K.P., Studies on the mechanism of acquired tolerance by rats to O,O-diethyl S-2-(ethythio)-ethyl phosphorodithioate (di-syston). Arch. Int. Pharmacol. 149, 560-566 (1964)

BROWN,H.R. and SHARMA,R.P., Synaptosomal adenosine triphosphatase (ATPase) inhibition by organophosphates. Experientia 32, 1540-1542 (1976)

BRUNETTE,D.M. and TILL,J.E., A rapid method for the isolation of L-cell surface membranes using an aqueous two-phas polymer system. J. Membr. Biol. 5, 215-224 (1971)

BÜCHNER,F. und ONISHI,Sh., Herzhypertrophie und Herzinsuffizienz in der Sicht der Elektronenmikroskopie, (Hrsg. F. Büchner). Urban & Schwarzenberg, München, Berlin, Wien 1970

BURN,J.H., VAUGHAN WILLIAMS,E.M. and WALKER,J.M., The production of block und auricular fibrillation in the heart-lung preparation by inhibitors of cholinesterase. Br. Heart J. 17, 431-447 (1955)

CHANG,C.G., CHEN,T.F. and CHUANG,S.-T., Influence of chronic neostigmine treatment on the number of acetylcholine receptors and the release of acetylcholine from the rat diaphragm. J.Physiol. 230, 613-618 (1973)

CLARMANN v.,M. und GELDMACHER-MALLINCKRODT v.,M., Über eine erfolgreich behandelte akute orale Vergiftung durch Fenithion und dessen Nachweis in Mageninhalt und Harn. Arch. Toxicol. 22, 239-267 (1967)

DAHL,J.L. and HOKIN,L.E., The sodium-potassium adenosine-triphosphatase. Annu. Rev. Biochem. 43, 327-356 (1974)

DIPALMA,J.R., McMICHAEL,R. and CIACCIO,E.J., Inhibition of muscle ATPase by phosphorus anticholinesterase compounds. Pharmacologist 12, 224 (1970)

DOMSCHKE,S., DOMSCHKE,W. und CLASSEM,M., Zum Mechanismus der Leberschädigung durch Alkylphosphate. Naturwissenschaften 58, 575 (1971)

DRANSFELD,H. und LIPINSKI,J., Der Einfluß von Kobalt auf die Aktivität der Transport-ATPase. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharm. Exp. Path. 266, 315-316 (1970)

ELIAKIM,M., BELLET,S., TAWIL,E. and MULLER,O., Effect of vagal stimulation and acetylcholine on the ventricle. Circ. Res. 9, 1372-1379 (1961)

ENGEL,H.J., JANOCHA,C. und KUEHNS,K., Herz- und Leberschädigungen bei einem Vergiftungsfall mit Alkylphosphaten. In: Poison Control. Entgiftungsprobleme, (Hrsg. H.P. Tombergs), Dr. Steinkopff, Darmstadt 1974

ERDMANN,W.D. und LENDLE,L., Vergiftungen mit esterase-blokkierenden Insektiziden aus der Gruppe der organischen Phosphorsäureester (E 605 und Verwandte). Ergeb. Inn. Med. Kinderheilk. 10, 104-184 (1958)

ERDMANN,W.D., Ein neues Antidotprinzip zur Behandlung von Alkylphosphatvergiftungen. Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 263, 61-72 (1969)

FIRTH,J.A., Cytochemical approaches to the localization of specific adenosine triphosphatases. Histochem. J. 10, 253-269 (1978)

FREDERICKSON,T. and BIGELOW,I.K., Tissue distribution of P-32 labeled parathion. Arch. Environ. Health 2, 663-667 (1961)

GAISBERG v.,U. und DIETERLE,K., Organ-Parenchymschäden nach E 605-Vergiftung bzw. hochdosierter Toxogoninbehandlung. Dtsch. Ärzteblatt 64, 1791-1792, 1794-1796 (1967)

GERICKE,Ch., HETTWER,H. und STAIB,W., Changes in fatty acid pattern of plasma membranes and of mitochondria in rat liver after poisoning with organophosphates. Biochem. Exp. Biol. 12, 293-305 (1976)

GLOW,P.H., OPIT,L.J. and CHARNOCK,J.S., Elevated sodium plus potassium activated adenosinetriphosphatase in rats after chronic diisopropylfluorophosphate poisoning. Arch. Int. Pharmacodyn Ther. 198, 22-28 (1972)

GLYNN,I.M., Membrane adenosine triphosphatase and cation transport. Br. Med. Bull. 24, 165-169 (1968)

GLYNN,I.M. and KARLISH,S.J.D., The sodium pump. Annu. Rev. Physiol. 37, 13-55 (1975)

GROB,D., Anticholinesterase intoxication in man and its treatment. In: Handbuch der experimentellen Pharmakologie. Ergänzungswerk XV, Cholinesterase and Anticholinesterase Agents (Hrsg. G.B. Koelle). Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg 1963

GROMOV,A.E. and ROZENGART,V.I., Changes in the micro-circulation during poisoning by organophosphorus cholinesterase inhibitors. Bull. Exp. Biol. Med. 81, 33-35 (1976)

HAHN,F., Fragen aus der Praxis, Kann das Pflanzenschutzmittel E 605 eine Angina pectoris oder einen Myokardinfarkt auslösen? Dtsch. Med. Wochenschr. 81, 209 (1956)

HARRIS,E.J. and HUTTER,O.F., The action of acetylcholine on the movements of potassium ions in the sinus venosus of the heart. J. Physiol. 132, 58-59 (1956)

HASPER,B., Ultramikroskopische Herzmuskelveränderungen nach wiederholter Hypoxie. Beitr. Pathol. 130, 321-351 (1964)

HASSELBACH,W. und WEBER,H.H., Contractile Adenosintriphosphatasen. In: Handbuch der physiologisch und pathologisch-chemischen Analyse, Hoppe-Seyler/Thierfelder (Hrsg. K. Lang, E. Lehnartz, O. Hoffmann-Osterhof, G. Siebert), 10. Auflage. Springer Berlin, Heidelberg, New York 1966

HEERING,H. Das EKG der Ratte bei Paraoxon-Intoxikation unter Einwirkung von Atropin und Pralidoxim (2-PAM). Arch. Int. Pharmacodyn Ther. 186, 321-338 (1970)

HETTWER,H., Über die Veränderungen an der Ultrastruktur der Rattenniere nach Phosphorsäureestervergiftung. Acta Histochem. 52, 165-210 (1975)

HETTWER,H., Möglichkeiten einer kombinierten Antidotherapie bei Vergiftungen mit Phosphorsäureestern an Ratten. In: Die medikamentöse Beeinflussung oxidativer Zellstoffwechselprozesse und ihre klinische Bedeutung. Schnetztor, Konstanz 1977

HETTWER,H. und GERICKE,Ch., Lipide der Plasmamembranen und der Mitochondrien aus Rattenleber nach Paraoxon-Intoxikation. Arch. Toxicol. 38, 252-260 (1977)

HETTWER,H., Über die Wirkung von Organophosphaten auf einige Rattenorgane. Morphologische und biochemische Untersuchungen. In: Europ. Hochschulschriften Reihe 7, Medizin: Abt. A, Pharmakologie, Bd. 3; Lang, Frankfurt/ Main 1981

HOKIN,L.E., YODA,A. and SANDHU,R., Irreversible inhibition of adenosine triphosphatases, diglyceride kinase and phosvitin kinase of brain by diisopropylphosphorofluoridate. Biochim. Biophys. Acta 126, 100-116 (1966)

HOLMES,J.H., STARR,H.G., HANISCH,R.C. and KAULLA v.,K.N., Short-term toxicity of mevinphos in man. Arch. Environ. Health 29, 84-89 (1974)

HÜLSMANN,W.C., BETHLEM,J., MEIJER,A.E.F.H., FLEURY,P. and SCHELLENS,J.P.M., Myopathy with abnormal structure and function of muscle mitochondria. J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 30, 519-525 (1967)

HÜLSMANN,W.C., MEIJER,A.E.F.H., BETHLEM,J. and VAN WIJNGAARDEN,G.K., Different mitochondrial species in human skeletal muscle. In: Muscle deseases, proceedings of an international congress, Milan 1969, (eds. J.N. Walton, N. Canal, G. Scarlato). Excerpta Medica, Amsterdam 1970

ITO,Y. and CHIDSEY,Ch.A., Intracellular calcium and myocardial contractility IV. Distribution of calcium in the failing heart. J. Mol. Cell. Cardiol. 4, 507-517 (1972)

ITO,Y., SUKO,J. and CHIDSEY,Ch.A., Intracellular calcium and myocardial contractility V. Calcium uptake of sarkoplasmatic reticulum in hypertrophied and failing rabbit hearts. J. Mol. Cell. Cardiol. 6, 237-247 (1974)

JENNINGS,R.B., HERDSON,P.B. and SOMMERS,H.M., Structural and functional abnormalities in mitochondria isolated from ischemic dog myocardium. Lab. Invest. 20, 548-557 (1969)

JOVIC,R., BACHELARD,H.S., CLARK,A.G. and NICHOLAS,P.C., Effects of soman and DFP in vivo and in vitro on cerebral metabolism in the rat. Biochem. Pharmacol. 20, 519-527 (1971)

JUNGERMANN,K. und MÖHLER,H., Biochemie. Springer Berlin, Heidelberg, New York 1980

KATZ,A.M. and HECHT,H.H., The early "pump" failure of the ischemic heart. Am. J. Med. 47, 497-502 (1969)

KATZ,A.M., Physiology of the heart. Raven Press, New York 1977

KLEMM,D., BLÜMCHEN,G., PFANNENSTIEL,P., VOGEL,W. und BECK,K., Cholostatische Hepatose nach Toxogoninbehandlung bei einem Fall von Alkylphosphatvergiftung. Med. Klin. 63, 94-96 (1968)

KRAUSE,W., SCHRÖDER,R. und WULFF,E., Ungewöhnlicher Verlauf einer Intoxikation durch Schädlingsbekämpfungsmittel (Detmol-Konzentrat VAP). Dtsch. Med. Wochenschr. 52, 2612-2616 (1970)

LAHIRI,A.K. and WILSON,I.B., On the inhibition of (Na^+/K^+)-activated adenosine triphosphatase by diisopropylfluorophosphate. Mol. Pharmacol. 7, 46-51 (1970)

LIN,T.-J. and MORALES,M.F., Application of a one-step procedure for measuring inorganic phosphate in the presence of proteins: The actomyosin ATPase system. Anal. Biochem. 77, 10-17 (1977)

LOOMIS,T.A. and SALAFSKY,B., Some effects of soman on neuromuscular function and on acetylcholinesterase in the rat. J. Pharmacol. 144, 301-309 (1964)

LÜDERITZ,B., BOELCKE,G., GAAZ,J.W., SCHMIDT,H. und RIECKER, G., Wiederholte kriminelle Vergiftung mit Nitrostigmin (E 605^R forte). Dtsch. Med. Wochenschr. 99, 529-533 (1974)

MEIJER,A.E.F.H., Histochemical method for the demonstration of myosin adenosine triphosphatase in muscle tissues. Histochemistry 22, 51-58 (1970)

MEIJER,A.E.F.H. and VLOEDMAN,A.H.T., The histochemical characterization of the coupling state of skeletal muscle mitochondria. Histochemistry 69, 217-232 (1980)

MEZON,B.J.,WROGEMANN,K. and BLANCHAER,M.C., Differing populations from the skeletal muscle of normal and dystrophic hamsters. Can. J. Biochem. 52, 1024-1032 (1974)

MITCHELL,P., A chemiosmotic molecular mechanism for proton translocating adenosine triphosphatases. FEBS Lett. 43, 189-194 (1974)

MURTHA,E.F. and WILLS,J.H., The effect of several organophosphorus compounds on the isolated cardiac muscle. Arch. Int. Pharmacodyn Ther. 150, 62-66 (1963)

NAMBA,T., GREENFIELD,M. and GROB,M.D., Malathion poisoning. Arch. Environ. Health 21, 533-541 (1970)

NAMBA,T., Cholinesterase inhibition by organophosphorus compounds and its clinical effects. Bull. WHO 44, 289-307 (1971)

NAYLER,W.G., Calcium exchange in cardiac muscle: basic mechanism of drug action. Br. Heart J. 73, 379-394 (1967)

OKONEK,S., Aktuelle Gesichtspunkte zur Intoxikation durch Alkylphosphate. Internist 16, 123-130 (1975)

OKONEK,S., Akute Nitrostigmin-Intoxikation des Menschen. Med. Habil., Mainz 1977

OOSTERBAAN,R.A. and COHEN,J.A., The active site of esterases. In: Structure and activity of enzymes (eds. T.W. Goodwin, J.I. Harris and B.S. Hartley), Academic Press, New York 1964

PASI,A. und LEUZINGER,S., Die Intoxikation durch Alkylphosphate. Schweiz. Militärmed. 47, 3, 127-150 (1970)

PRASAD,K., Potassium-induced changes in the electromechanical and ATPase activity of guinea pig heart. Jpn Heart J. 17, 211-221 (1976)

PRINZ,H.J., Therapie akuter Alkylphosphat-Vergiftungen. Dtsch. Ärzteblatt 64, 1845-1849 (1967)

PRINZ,H.J., Eine schwere percutane Vergiftung mit Parathion (E 605). Arch. Toxicol. 25, 318-328 (1969)

RAMACHANDRAN,B.V., The influence of DFP,atropine and pyridinium aldoximes on the rate of clearance of diisopropyl phosphate ($DI^{32}P$) from the mouse circulatory system. Biochem. Pharmacol. 16, 2061-2068 (1967)

REISLER,E., BURKE,M. and HARRINGTON,W.F., Cooperative role of two sulhydryl groups in myosin adenosine triphosphatase. Biochemistry 13, 2014-2022 (1974)

RIDER,J.A., ELLINWOOD,L.E. and COON,J.M., Production of tolerance in the rat to octamethyl pyrophosphoramide (OMPA). Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 81, 455-459 (1952)

SACHS,G. and HIRSCHOWITZ,B.I., Effect of diisopropyl-fluorophosphate on gastric secretion and gastric ATPase. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 120, 702-704 (1965)

SACHS,G., FINLEY,E.Z., TSUJI,T. and HIRSCHOWITZ,B.I., Effect of irreversible inhibition on transport-ATPase. Arch. Biochem. Biophys. 134, 497-499 (1969)

SCHEURER,J. and BHAN,A.K., Cardiac contractile proteins; adenosinetriphosphatase activity and physiological function. Circ. Res. 45, 1-12 (1979)

SEAGREN,S.C., SKELETON,C.L. and POOL,P.E., Relation of cardiac myofibrillar ATPase activity to increased contractile state. Am. J. Physiol. 220, 847-851 (1971)

SEIDEL,J.C., Similar effects on enzymatic activity due to chemical modification of either of two sulfhydryl groups of myosin. Biochim. Biophys. Acta 180, 216-219 (1969)

SEKINE,T., BARNETT,M. and WAYNE KIELLEY,W., The active site of myosin adenosine triphosphatase, I. Localization of one of the sulhydryl groups. J. Biol. Chem. 237, 2769-2772 (1962)

SKOU,J.C., Enzymatic basis for active transport of Na^+ and K^+ across cell membrane. Physiol. Rev. 45, 596-617 (1965)

WHITTAM,R., The asymmetrical stimulation of a membrane adenosine triphosphatase in relation to ative cation transport. Biochem. J. 84, 110-118 (1962)

WOLTHUIS,O.L. and MEETER,E., Cardiac failure in the rat by diisopropylfluorophosphate (DFP). Eur. J. Pharmacol. 2, 387-392 (1968)

YAZAKI,Y., UEDA,S., NAGAI,R. and SHIMADA,K., Cardiac atrial myosin adenosine triphosphatase of animals and humans. Circ. Res. 45, 522-527 (1979)

LEBENSLAUF

Am 24. September 1956 wurde ich als Tochter des kaufmännischen Angestellten Norbert Dierkes und seiner Ehefrau Elisabeth Dierkes, geb. Arendt, in Krefeld geboren.

Nach vierjährigem Besuch der katholischen Volksschule St. Elisabeth Krefeld wechselte ich 1966 auf das Mädchengymnasium Marienschule in Krefeld und bestand dort am 4. Juni 1975 das Abitur.

Seit April 1976 studiere ich an der Universität Düsseldorf Humanmedizin und absolvierte im März 1978 die ärtzliche Vorprüfung, im März 1979 das 1. und im darauf folgenden Jahr das 2. Staatsexamen.

Seit April 1981 bin ich mit dem Arzt Dr. Erich Tizek verheiratet.

Die experimentellen Untersuchungen für meine Dissertation erfolgten vom Mai 1979 bis zum Februar 1980 im Anatomischen Institut II der Universität Düsseldorf.